Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Freien Universität Berlin im Städtischen Krankenhaus Westend

Ehemaliger Direktor:
Professor Dr. med. Gotthard S c h e t t l e r

Untersuchungen über die Phosphatidzusammensetzung des Serums von Normalpersonen und Patienten mit Arteriosklerose

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dieter Lang
aus
Geislingen an der Steige

1965

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Freien Universität Berlin im Städtischen Krankenhaus Westend

Ehemaliger Direktor:
Professor Dr. med. Gotthard S c h e t t l e r

Untersuchungen über die Phosphatidzusammensetzung des Serums von Normalpersonen und Patienten mit Arteriosklerose

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

vorgelegt von
Dieter Lang
aus
Geislingen an der Steige

Dekan: Professor Dr. med. Adalbert L o e s c h k e
Referent: Professor Dr. med. Gotthard S c h e t t l e r
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Friedrich L i n d l a r

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 30. Juni 1965

Inhalt

	Seite
A. Einleitung	5
B. Methodik	7
1. Auswahl der Versuchspersonen und Gewinnung des Blutserums	7
2. Herstellung des Serumlipidextraktes	8
3. Bestimmung der Gesamtlipide	8
4. Bestimmung der einzelnen Phosphatidfraktionen	11
a. Bestreichen der Platten	11
b. Auftragen des Serumlipidextraktes	12
c. Dünnschichtchromatographie	12
d. Nachweis der getrennten Serumphosphatide	12
e. Phosphorbestimmung in den getrennten Phosphatiden	13
C. Ergebnisse	20
D. Diskussion	24
E. Zusammenfassung	30
F. Tabellen	31
G. Literaturverzeichnis	35

A. Einleitung

Zu den Lipiden des menschlichen Blutserums im engeren Sinne rechnet man das Cholesterin und seine Ester, die Neutralfette, die freien Fettsäuren und die Phosphatide. Letztere lassen sich aufteilen in cholinhaltige (Lecithin und Lysolecithin, Sphingomyelin) und cholinfreie Substanzen (Colamin- und Serinkephalin).

Die 1910 von WINDAUS (42) veröffentlichte Untersuchung über den Gehalt normaler und atheromatös veränderter Aorten an Cholesterin und Cholesterinestern, in welcher erstmals eine starke Zunahme des Cholesterins in den krankhaft veränderten Aorten gefunden wurde, gab den Anstoss zu intensiven Untersuchungen über den Cholesteringehalt des Blutserums bei Gesunden und bei Arteriosklerosekranken.

Als Normalwert für den Gesamtcholesteringehalt des Serums ist nach THANNHAUSER 150-260 mg%, nach SCHETTLER (33) 160-260 mg% anzusehen. In diesem Bereich steigen bei der männlichen Bevölkerung die Werte langsam vom 20. bis etwa 55. Lebensjahr an, um dann wieder leicht abzufallen [KEYS u. Mitarb. (23)]. Bei Frauen vollzieht sich der Anstieg langsamer, erst nach der Menopause nähern sich die Werte wieder den männlichen.

Bei Kranken mit Koronarsklerose oder allgemeiner Arteriosklerose wurden von fast allen Autoren in 70-90% der Fälle pathologische Cholesterinwerte im Serum gefunden. Dies gilt vor allem für jüngere Infarktkranke, während bei älteren signifikante Unterschiede gegenüber gleichaltrigen Gesunden nicht mehr so häufig zu beobachten sind [BJÖRNTORP und MALMCRONA (5), LUND u. Mitarb. (26)]. Auch bei Kranken mit Zerebralinfarkten auf arteriosklerotischer Basis fand man eindeutig erhöhte Serumcholesterinspiegel [HEYMAN u. Mitarb. (20)]. Allerdings kommen auch bei Gesunden erhebliche Schwankungen im Cholesteringehalt des Serums vor [THOMAS u. Mitarb. (40)]. Pathologische Cholesterinwerte sind demnach, namentlich bei einmaliger Analyse, keineswegs beweisend für das Vorliegen einer Arteriosklerose. SCHRADE u. Mitarb. (35) fanden bei 31 Arteriosklerosekranken eine Vermehrung aller Serumlipidfraktionen mit Ausnahme der frei-

en Fettsäuren. Dabei waren die Neutralfette am stärksten erhöht (von 217 mg% auf 443 mg%). In jüngster Zeit stellten ALBRINK und MAN (2) fest, dass bei 115 Patienten, die einen Myokardinfarkt erlitten hatten, nur 47% der Kranken über 260 mg% erhöhte Serumcholesterinwerte aufwiesen. Demgegenüber überschritt bei 82% der Patienten die Konzentration der Serumtriglyceride den Normalwert von 5,4 mval/l.

Schon länger weiss man, dass Erhöhungen des Cholesterins häufig mit solchen der Phosphatide einhergehen [GERTLER u. Mitarb. (15)], deren Normalwert im Serum mit 150-250 mg% anzugeben ist. Dabei ist der Quotient Cholesterin /Phosphatide mit 1 verhältnismässig konstant und verschiebt sich erst im Alter allmählich zugunsten des Cholesterins [SCHAEFER u. Mitarb. (32)]. Das annähernd gleichbleibende Verhältnis ist für die optische Klarheit des Serums von Bedeutung [AHRENS und KUNKEL (1)]. Eine deutliche Erhöhung der Phosphatidkonzentration im Serum von Männern mit Myokardinfarkt fanden CHAPIN und PROGER (7). Diese Veränderung war durch eine Zunahme der Phosphatide der β-Lipoproteidfraktion bedingt. Zum gleichen Ergebnis gelangte COHEN (8) bei der Untersuchung von 20 Kranken mit Infarkt bzw. Stenokardien. Die von diesem Autor erfasste signifikante Erhöhung der Phosphatide setzte sich aus Vermehrungen der cholinhaltigen und der cholinfreien Phosphatide zusammen, wobei die erste Gruppe die stärkere Zunahme zeigt. SMITH (36) ist der Auffassung, dass die Vermehrung der Cholinphosphatide durch Sphingomyeline bedingt ist.

Die Bedeutung der phosphorhaltigen Lipide geht auch aus den Befunden von LEUPOLD und WIELAND (25) hervor, die bei der Untersuchung von gesunden, aber beruflich stark belasteten Personen neben einer signifikanten Erhöhung der Neutralfette auch eine solche der Phosphatide fanden, während der Cholesteringehalt im Normbereich lag. Möglicherweise kommt es in diesen beiden Lipidfraktionen zu den ersten analytisch fassbaren Veränderungen bei der Entwicklung einer Arteriosklerose. Neben der Bedeutung, welche die Phosphatide für den Stoffwechsel der Aminosäuren haben [GABY und SILBERMAN (14), HENDLER (19)], ist auch ihre wichtige Rolle beim Vor-

gang der Blutgerinnung hervorzuheben. Nachdem mehrfach beobachtet wurde, dass nach fettreichen Mahlzeiten Koronarthrombosen auftraten [KOMMERELL (24)], war ein Hinweis auf die Lipidnatur gerinnungsfördernder Substanzen gegeben. ROBINSON und POOLE (31) stellten bei in vitro-Versuchen fest, dass das gerinnungsfördernde Prinzip hauptsächlich in der Phosphatidfraktion vorhanden ist. Die Kephaline, insbesondere das Colaminkephalin, erwiesen sich als besonders gerinnungsaktiv.

Ausgehend von der Vorstellung, dass Fibrinauflagerungen an der Intima möglicherweise die Anfänge arteriosklerotischer Gefässveränderungen darstellen [DUGUID (11)], bestimmten NOTHMAN und PROGER (29) den Gesamtphosphatidgehalt und die Kephalinkonzentration im Serum von Gesunden und von Arteriosklerosekranken. Neben einer Vermehrung der Gesamtphosphatide fanden sie bei den Patienten einen 2-3-mal so hohen Kephalingehalt wie bei den Gesunden. Wegen der grossen diagnostischen Bedeutung dieser Befunde wurden sie in der vorliegenden Arbeit nachgeprüft, wobei die Phosphatide des Serums direkt nach dünnschichtchromatographischer Trennung bestimmt wurden.

B. Methodik

1. Auswahl der Versuchspersonen und Gewinnung des Blutserums.

Zur Untersuchung gelangten 20 gesunde Personen im Alter von 21 bis 39 Jahren (Durchschnittsalter 26,3 Jahre). Darunter befanden sich 10 männliche und 10 weibliche Probanden, vorwiegend Kommilitonen und Mitarbeiter im Laboratorium. Von den 20 Kranken mit klinisch gesicherter Arteriosklerose litten 10 an Koronarsklerose, 6 an Zerebralsklerose (z. T. mit apoplektischem Insult); 4 hatten 1-3 Wochen zuvor einen Myokardinfarkt erlitten. Das Alter der 8 männlichen und 12 weiblichen Patienten lag zwischen 45 und 84 Jahren (Durchschnittsalter 67 Jahre).

Nachdem den Versuchspersonen am Vorabend eine fettarme

Mahlzeit verabreicht worden war, wurden ihnen morgens nüchtern durch Venenpunktion 30-40 ml Blut entnommen. Nach Retraktion des Blutkuchens wurde die Blutprobe 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, das Serum abpipettiert und alsbald weiterverarbeitet.

2. Herstellung des Serumlipidextraktes.

10 ml Serum wurden unter Schütteln in 150 ml des Extraktionsmittels Chloroform-Methanol (1:1) tropfenweise einpipettiert und das Gemisch danach im Wasserbad kurz zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit dem Extraktionsmittel auf 250 ml aufgefüllt und durch eine Glasfritte (G 3) filtriert. Der Eiweissniederschlag wurde mit ca. 50 ml Extraktionsmittel nachgewaschen. Die vereinigten Extrakte wurden am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40° C unter Stickstoff im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in 5 ml Chloroform-Methanol (1:1) aufgenommen. Diese Lösung überführte man in ein 5 ml-Messkölbchen und bewahrte sie unter Stickstoff im Kühlschrank bis zur Weiterverarbeitung auf. Diese erfolgte stets an demselben oder darauffolgenden Tag.

3. Bestimmung der Gesamtlipide.

Die Bestimmung der Gesamtlipide erfolgte nach der von ZÖLLNER und KIRSCH (43) angegebenen Methode mittels der Sulphophosphovanillin-Reaktion. Zur Herstellung einer geeigneten Lösung, die in 1 ml im Mittel 30-70 γ Lipide enthielt, wurden 0,5 ml des Extraktes mit Chloroform auf das 500-fache verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurde in Doppelbestimmungen je 1 ml in ein sorgfältig in Chromschwefelsäure gereinigtes Reagensglas einpipettiert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Lösung nicht an die Wand des Reagensglases gebracht wurde. Zur Bestimmung des Lösungsmittelleerwertes wurde dreimal je 1 ml des zur Verdünnung des Extraktes verwendeten Chloroforms eingemessen. Aus allen Proben wurde das Lösungsmittel im Wasserbad bei 60° C durch Einblasen von Stickstoff restlos verjagt. Dann wurden 0,2

ml konzentrierte Schwefelsäure zugegeben, wobei die Wände des Reagensglases bis etwas über den vorausgegangenen Stand des Lipidlösungsmittels benetzt wurden. Die Gläser erhitzte man darauf 10 Minuten im kochenden Wasserbad und kühlte sie anschliessend in einem Wasserbad von Zimmertemperatur. Aus einer Pipette mit möglichst grosser Ausflussöffnung wurden 5 ml des Phosphorsäure-Vanillin-Reagens zugegeben, das aus 4 Teilen Phosphorsäure und 1 Teil einer 0,6 %igen wässrigen Vanillinlösung durch sorgfältiges Mischen hergestellt worden war. Dabei wurde auf ein völliges Ausfliessen des zähen Reagens geachtet. 30 Minuten nach sehr gutem Durchschütteln des Reaktionsgemisches wurde die Extinktion der rosa gefärbten Lösung bei 530 mμ im Spektralphotometer PM Q II (ZEISS) in Kuvetten mit der Schichtdicke d = 1 cm gegen Luft abgelesen.

Zur Bestimmung einer Eichkurve wurde in 40 Seren der Gesamtlipidgehalt sowohl gravimetrisch nach SPERRY (38) als auch kolorimetrisch ermittelt. Zur Untersuchung gelangte das Blut von anderweitigen Personen, deren Serumlipidspiegel teils normal, teils erhöht waren. Diese Blutproben wurden ebenfalls am Morgen im Nüchternzustand gewonnen, nachdem am Abend zuvor eine fettarme Mahlzeit gegeben worden war. Im einzelnen wurde folgendermassen vorgegangen:

2 ml Serum wurden unter Umschütteln tropfenweise in einen 40 ml Chloroform-Methanol (1:1) enthaltenden Erlenmeyerkolben einpipettiert. Darauf wurde die Mischung im Wasserbad kurz aufgekocht und die Lipidlösung mittels einer Glasfritte (G 3) in einen 100 ml-Rundkolben filtriert. Der Eiweissniederschlag wurde mit 20 ml Chloroform nachgewaschen.

Zur Diffusionsreinigung nach FOLCH u. Mitarb. (13) wurde der Rundkolben durch Zugabe von destilliertem Wasser vollständig gefüllt und etwa auftretende Trübungen innerhalb der wässrigen Oberphase durch Zugabe von etwas Methanol zum Verschwinden gebracht. Der gefüllte Rundkolben wurde dann in ein mit destilliertem Wasser gefülltes 1 l-Becherglas gebracht und 12-15 Stunden lang zur Dialyse darin belassen. Mittels einer Wasserstrahlpumpe wurde sodann die wässrige Oberphase mit einer Kapillare abgesaugt, wobei darauf geachtet wurde, dass die trübe Grenzschicht nicht mit-

entfernt wurde, da sie Lipide enthält. Nun wurde bis zur Klärung der Chloroformphase Methanol zugesetzt. Diese Lösung dampfte man am Rotationsverdampfer unter Stickstoff im Vakuum bei einer Wasserbadtemperatur von 40° C zur Trockne ein. Der Rückstand wurde in etwas Chloroform (ca. 3ml) aufgenommen und in ein 10 ml-Messkölbchen übergeführt, wobei der Rundkolben mehrmals mit Chloroform nachgespült wurde. Das Messkölbchen wurde in ein Wasserbad von 40° C gebracht und der Extrakt durch Einblasen von Stickstoff zur Trockne eingeengt. Dann gab man das Messkölbchen bis zur Gewichtskonstanz in einen Schwefelsäure-Exsikkator, welcher vor dem Evakuieren jeweils mit Stickstoff gefüllt wurde. Das trockene Kölbchen wurde auf einer Halbmikrowaage gewogen und die Lipidmenge durch Subtraktion des zuvor ermittelten Leergewichts des Kölbchens bestimmt.

Nach dem Wägen wurden die Lipide in Chloroform gelöst und das 10 ml-Kölbchen bis zur Marke aufgefüllt. 0,5 ml dieser Lösung wurden dann mit Chloroform auf 50 ml verdünnt. 1 ml dieser verdünnten Lösung wurde in die oben beschriebene kolorimetrische Sulphophosphovanillin-Methode nach ZÖLLNER und KIRSCH (43) eingesetzt. Die erhaltenen Extinktionen lagen zumeist zwischen 0,1 und 0,4 und entsprachen 10-50γ Gesamtlipiden.

Abb.1 zeigt die Beziehung zwischen den gravimetrisch ermittelten Lipidwerten und den spektrophotometrisch gewonnenen Farbwerten. Die aus diesen Werten bestimmte Regressionsgerade hat die Gleichung $y = 0{,}015 + 0{,}00667\ x$ und zeigt einen steileren Anstieg als die von ZÖLLNER und KIRSCH (43) angegebene. Zur Bestimmung der Lipidmenge in γ müssen demnach von der gewonnenen Extinktion 0,015 subtrahiert und die sich daraus ergebende Zahl mit dem Faktor 149,9 multipliziert werden. Weitere Multiplikation mit 25 ergibt den Gesamtlipidgehalt in mg%.

Mit linearen Verdünnungen eines definierten Extraktes wurde ausserdem nachgewiesen, dass die Farbentwicklung der eingesetzten Gesamtlipidmenge proportional ist.

In zusätzlichen Versuchen wurde weiterhin festgestellt, dass die kolorimetrisch ermittelten Lipidwerte dialysierter und nichtdialysierter Serumextrakte identisch waren.

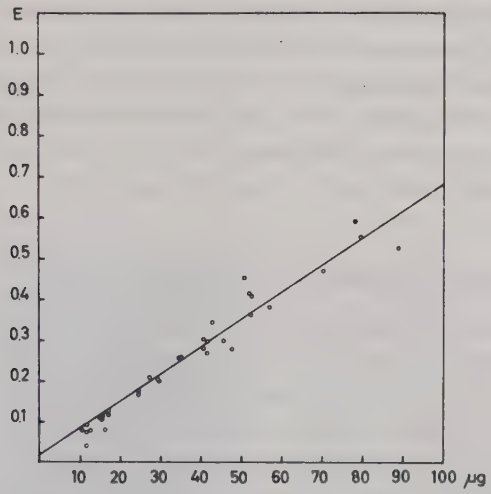


Abb.1. Beziehung zwischen Gesamtlipidgehalt (gravimetrisch) und Extinktion nach Sulphophosphovanillin-Reaktion (spektrophotometrisch bei 530 mµ).

4. Bestimmung der einzelnen Phosphatidfraktionen.

Die quantitative Bestimmung der Serumphosphatide erfolgte nach dem von HABERMANN u. Mitarb. (17) angegebenen Verfahren durch Phosphorbestimmung in den dünnschichtchromatographisch getrennten Phosphatiden. Dabei wurde folgendermassen vorgegangen:

a. Bestreichen der Platten.

In Chromschwefelsäure sorgfältig gereinigte Glasplatten (20 x 20 cm) wurden auf die Auftragschablone der Grundausrüstung zur Dünnschichtchromatographie (Fa. DESAGA, Heidelberg) gereiht und mit Azeton von etwa noch vorhandenen Fettspuren befreit. Zur Herstellung der Bestreichmasse wurden 60 ml bidestilliertes Wasser in eine Reibschale gegossen und 30 g Kieselgel (Kieselgel G für Dünnschichtchromatographie nach STAHL der Fa. MERCK, Darmstadt) auf die

Wasseroberfläche gestreut. Man wartete bis zur vollständigen Benetzung des Gels, mischte dann mit einem Pistill und füllte die homogene Masse sofort in das bereitgestellte, auf 0,25 mm Schichtdicke eingestellte Ausstreichgerät. Die Masse wurde dann umgehend auf den Platten ausgestrichen. Diese liess man an der Luft trocknen und aktivierte die Kieselgelschicht jeweils vor dem Gebrauch durch einstündiges Erhitzen bei 100° C.

b. Auftragen des Serumlipidextraktes.

Zum Auftragen des Serumlipidextraktes auf die beschichteten Glasplatten diente eine geeichte Blutzuckerpipette. Damit wurden 0,1 ml des Extraktes als aus einzelnen Flekken zusammengesetzter 1,5 cm langer Strich auf die 1,8 cm vom unteren Plattenrand entfernte Startlinie gebracht, wobei darauf geachtet wurde, dass man die Kieselgelschicht nicht verletzte. Zum schnelleren Antrocknen des Extraktes wurde ein Kaltluftfön benutzt.

c. Dünnschichtchromatographie.

Die dünnschichtchromatographische Trennung der Serumlipide wurde in einem Klimaraum bei 18° C durchgeführt. Gleich nach dem Einfüllen des Laufmittels, das nach HABERMANN u. Mitarb. (17) aus Chloroform-Methanol-Wasser (130 : 50 : 8) bestand, wurde die Dünnschichtplatte in die Trennkammer (Innenabmessungen 20,5 x 20,5 x 8 cm) gebracht und diese mittels eines Gummiringes,der zwischen Kammerrand und beschwertem Deckel eingefügt wurde, luftdicht abgeschlossen. Diese Abdichtung ist von besonderer Bedeutung, da nur bei dieser Anordnung das Fliessmittel gleichmässig aufsteigt. Das sonst geübte Abdichten mittels z. B. Silikonfett kann wegen der in der Kammer befindlichen Fettlösungsmittel zu Komplikationen führen. Die Chromatographie wurde jeweils bei einer Steighöhe von 18 cm, die meist nach etwa 1 1/2 Stunden erreicht wurde, beendet.

d. Nachweis der getrennten Serumphosphatide.

Die Dünnschichtplatte wurde nach Beendigung der Chromatographie bei 50° C getrocknet und mit einer Lösung von

40 mg Bromthymolblau in 100 ml 0,01 n NaOH durch Stickstoffdruck besprüht. Durch diese Behandlung erscheinen die einzelnen Lipid- bzw. Phosphatidfraktionen auf gelbem Untergrund blaugrün gefärbt, wobei der Lysolecithinfleck alsbald nach gelbweiss verblasst. Die Anordnung der einzelnen Fraktionen auf der Dünnschichtplatte ist aus Abb.2 ersichtlich.

Abb.2. Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Serumphosphatiden. Methodik s. Text.

e. Phosphorbestimmung in den getrennten Phosphatiden.

Auf der vom Besprühen noch feuchten Dünnschichtplatte wurden mittels einer über der Platte verschiebbaren und mit Millimetereinteilung versehenen Plexiglasschablone die zur Analyse bestimmten Areale der Phosphatidflecken bzw. Leerwerte mit einer Nadel umfahren und die Abmessungen für die spätere Flächenberechnung notiert. Die Art der Einteilung ist aus Abb.3 ersichtlich. Die Platte wurde dann bei 100° C getrocknet und die vorher bezeichneten Flächen mit der Kante eines Objektträgers voneinander getrennt. Das so abge-

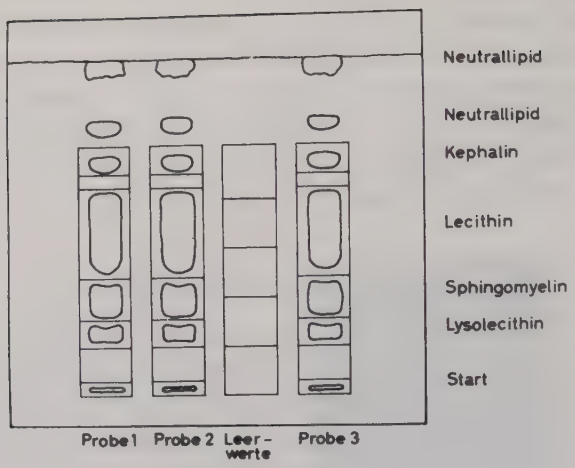


Abb.3. Anordnung der zur Phosphorbestimmung eingesetzten Substanz- und Leerwertbezirke.

schabte Kieselgel wurde mittels eines Trichters in dickwandige Reagensgläser überführt.

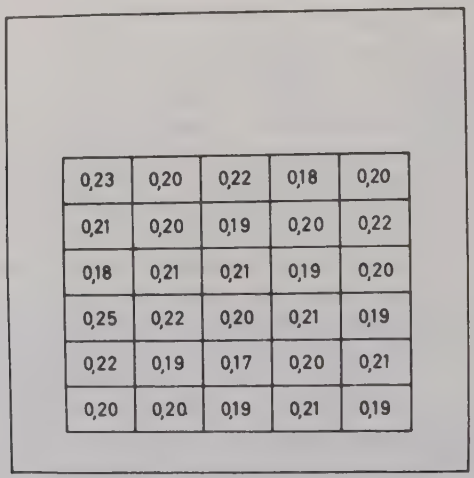
Die Phosphorbestimmung wurde nach der von BARTLETT (4) angegebenen Modifikation der Methode von FISKE und SUBBAROW (12) durchgeführt. Dazu wurden die zu analysierenden Proben mit 0,5 ml 10 n H_2SO_4 versetzt, durch Umschütteln gut durchmischt und anschliessend in einem Trockenschrank bei 155° C 4 Stunden lang verascht. Nach dem Abkühlen versetzte man jede Probe mit 4 Tropfen 30 %igem H_2O_2, mischte gut und erhitzte sie weitere 2 Stunden bei derselben Temperatur, bis alles Peroxyd zerstört und der Reagensglasinhalt farblos war. Dann wurden je 4,6 ml 0,22 %ige Ammoniummolybdatlösung und 0,2 ml des Fiske-Subbarow-Reagens zugesetzt, das durch Zugabe von 0,5 g 1-Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure zu 200 ml einer frisch zubereiteten 15 %igen Natriumbisulfitlösung unter Zusatz von 1 g wasserfreiem Natriumsulfit hergestellt wurde. Nach gründlichem Durchmischen wurden die Reagensgläser mit Glaskappen bedeckt, um das Verdampfen von Wasser zu verhindern.

Die Gläser wurden anschliessend 10 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt, wobei sich je nach Phosphorgehalt eine verschieden starke Blaufärbung entwickelte. Nach dem Abkühlen wurde der Reagensglasinhalt in Zentrifugengläser übergeführt und das Kieselgel 10 Minuten bei 3000 U/min abzentrifugiert. Anschliessend wurde die Extinktion der Farblösungen im Spektralphotometer PM Q II (ZEISS) bei 830 mμ gemessen (Ablesung gegen Luft, d = 1 cm). Da die Extinktion der von der Lecithinfraktion entwickelten Farbe meist oberhalb des günstigen Ablesebereichs lag, wurde dieses Reaktionsgemisch in einem bestimmten Verhältnis mit Wasser verdünnt. Nach der Extinktionsmessung wurde durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor der ursprüngliche Wert errechnet.

Zur Berechnung der in der untersuchten Probe enthaltenen Phosphormenge wurde die gefundene Extinktion mit einem Faktor multipliziert, der vom Alter des verwendeten Reagens abhing und sich aus der mitbestimmten Extinktion dreier Eichwerte (3, 4 und 5 γ Phosphor als Dinatriumphenylphosphat) ergab. Dieser Umwandlungsfaktor lag in der Regel zwischen 5,6 und 5,8. Der gefundene Wert entsprach der in 0,1 ml Extrakt = 0,2 ml Serum enthaltenen Phosphormenge in γ. Zur Umrechnung auf mg/100 ml Serum musste dieser Wert folglich mit 500 x 1000 multipliziert werden. Die Phosphatidmenge in mg% errechnete man dann durch weitere Multiplikation mit dem Faktor 25.

Die auf die Chromatographieplatte gebrachte Kieselgelschicht enthält immer anorganischen Phosphor in Mengen von 0,03 - 0,05 γ pro cm^2 je nach Schichtdicke. Es war daher zu untersuchen, ob dieser Phosphorgehalt sich gleichmässig auf die ganze Dünnschichtplatte verteilt und ob die fünf 6 cm^2 grossen Areale, die auf jeder zur Untersuchung gelangten Platte für die Berechnung der Leerwerte herangezogen wurden, für den Phosphorgehalt repräsentativ waren. Zu diesem Zweck wurde eine in der üblichen Weise mit einer 0,25 mm dicken Kieselgelschicht bestrichene und aktivierte Dünnschichtplatte der Chromatographie unterworfen, getrocknet und besprüht, die Kieselgelschicht in 30 Felder von je 6 cm^2 unterteilt und in diesen der Phosphorgehalt bestimmt. Abb.4

zeigt die Leerwertverteilung auf dieser Platte. In 9 Feldern lag der Leerwert unter dem Mittelwert, in 12 Feldern darüber und in 9 Feldern war er gleich dem Mittelwert. Der im Kieselgel als Verunreinigung vorhandene anorganische Phosphor ist demnach annähernd gleichmässig über die Dünnschichtplatte verteilt.



0,23	0,20	0,22	0,18	0,20
0,21	0,20	0,19	0,20	0,22
0,18	0,21	0,21	0,19	0,20
0,25	0,22	0,20	0,21	0,19
0,22	0,19	0,17	0,20	0,21
0,20	0,20	0,19	0,21	0,19

Abb.4. Kieselgelleerwerte in γ bei 30 Feldern von 6 cm^2 Grösse und einer Schichtdicke von ca. 0,25 mm.

Um bei den quantitativen Bestimmungen eventuell vorkommendes Lysokephalin nicht zu übersehen, wurde das Dünnschichtchromatogramm der Serumphosphatide eines Gesunden und eines Arteriosklerosekranken mit Ninhydrin (0,3 Ninhydrin, 100 ml n-Butanol, 3 ml Eisessig) besprüht. Abb.5 zeigt die einzelnen ninhydrin-positiven Fraktionen, deren Phosphorgehalt nach BARTLETT (4) bestimmt wurde. Um zu sehen, wo die Lysokephalinfraktion auf einem Dünnschichtchromatogramm zu suchen sein würde, chromatographierte man eine geringe Menge eines Lysokephalinpräparates allein und nach Zusatz zum Lipidextrakt eines Normalserums und besprühte es mit Ninhydrin (Abb.6). Die Zuordnung der erhaltenen ninhydrin-positiven Flecke zu den ninhydrin-negativen

Phosphatidfraktionen erbrachte das mit Phosphorammoniummolybdatlösung (5,0 Phosphorammoniummolybdat, 100 ml 90-%iges Äthanol) übersprühte Ninhydrinchromatogramm(Abb.7).

Abb.5. Dünnschichtchromatogramm der Serumphosphatide eines Gesunden (links) und eines Arteriosklerosekranken (rechts). Ninhydrinfärbung.

Danach befindet sich die Lysokephalinfraktion zwischen den Flecken des Lecithins und des Sphingomyelins. Der oberste ninhydrin-positive Fleck im Dünnschichtchromatogramm des Serumlipidextraktes entspricht dem Kephalin. Die unteren etwa sieben z. T. stark ninhydrin-positiven Substanzen liegen im unteren Anteil der Sphingomyelinfraktion, im Bereich des Lysolecithinfleckes sowie im Startbereich. Bei diesen dürfte es sich um Oligopeptide handeln [THIELE und WOBER (39)].

Um diese ninhydrin-positiven Verunreinigungen auszuschliessen und die von NOTHMAN und PROGER (29) mit anderer Methodik untersuchten Lipidfraktionen dünnschichtchromatographisch zu charakterisieren, wurde nach dem Verfahren von AXELROD u. Mitarb. (3) ein Lipidextrakt durch Fällung mittels einer kolloidalen Eisenlösung gewonnen. 2 ml eines Normalserums wurden zusammen mit 30 ml destilliertem Wasser, 2,5 ml der dialysierten Eisenlösung [hergestellt nach

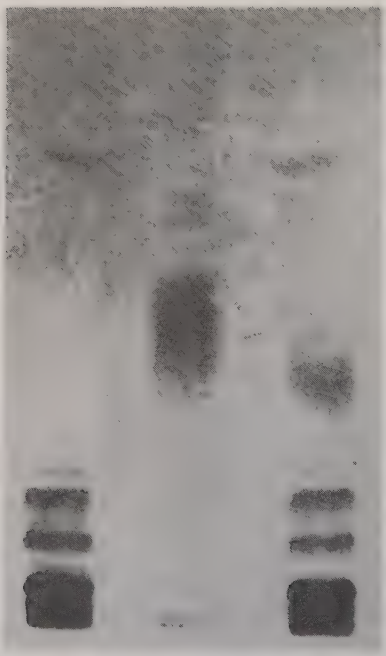


Abb.6. Dünnschichtchromatogramm von Lysokephalin allein (Mitte) und nach Zusatz zum Lipidextrakt eines Normalserums (rechts). Links das Chromatogramm eines Normalserums zum Vergleich. Ninhydrinfärbung.

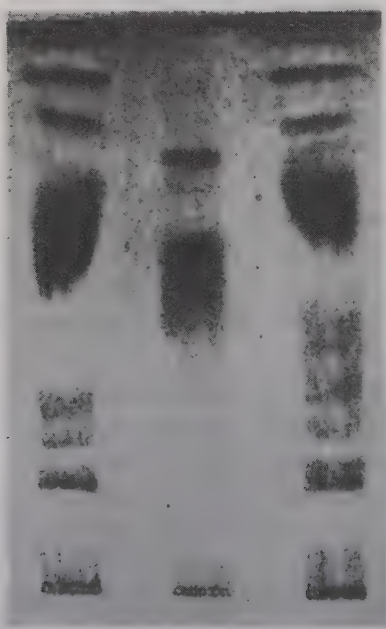


Abb.7. Gleiches Dünnschichtchromatogramm wie in Abb.6. Phosphorammoniummolybdatfärbung nach vorhergegangener Ninhydrinfärbung.

JANDER (21)] und 1,3 ml 50 %iger Magnesiumsulfatlösung in ein Zentrifugenglas einpipettiert und gut gemischt. Darauf wurde das Gemisch 10 Minuten lang bei 3000 U/min zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit durch Dekantieren entfernt. Das Präzipitat wurde dreimal durch Aufwirbeln in 30 ml Wasser und 1,3 ml 50 %iger Magnesiumsulfatlösung und erneutes Zentrifugieren gewaschen, anschliessend in 4 ml absoluten Äthanols suspendiert und in einen 50 ml-Schüttelzylinder übergeführt. Zur quantitativen Überführung wurde mit weiteren 4 ml absoluten Äthanols und zweimal mit 4 ml Diäthyläther nachgewaschen. Dann wurde mit Diäthyläther auf 20 ml aufgefüllt. Durch 5 Minuten langes kräftiges Schütteln extrahierte man die Lipide aus dem Präzipitat, filtrierte die Lösung und brachte den Lipidextrakt am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40° C unter Stickstoffschutz im Vakuum zur Trockne. Der Rückstand wurde in 1 ml Chloroform-Methanol (1:1) aufgenommen. Die Phosphatide von 0,1 ml des Extraktes wurden in der üblichen Weise dünnschichtchromatographisch getrennt und das gewonnene Chromatogramm mit Ninhydrin angefärbt. Nach Abb.8 entfernt die beschriebene Präzipitation mittels kolloida-

Abb.8. Dünnschichtchromatogramm eines in üblicher Weise gewonnenen Serumlipidextraktes (links) und der nach AXELROD u. Mitarb. (3) mittels Eisenfällung erhaltenen Serumlipidfraktion (rechts). Ninhydrinfärbung.

ler Eisenlösung alle ninhydrin-positiven Verunreinigungen im unteren Drittel des Dünnschichtchromatogramms. Als einzige ninhydrin-positive Substanz bleibt neben einer geringen Anfärbung am Start die Kephalinfraktion darstellbar.

C. Ergebnisse

Die durch Phosphorbestimmung in der Kieselgelschicht von 30 Arealen ermittelten Leerwerte lagen zwischen 0,17γ und 0,25γ/6 cm^2 (Abb.4). Der Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung betrug 20,3 ± 1,6γ/6 cm^2.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen, wurde der Phosphorgehalt der dünnschichtchromatographisch getrennten Phosphatidfraktionen eines Serumlipidextraktes durch zehnmalige Bestimmung ermittelt. Die chromatographierten Extraktmengen entsprachen jeweils 0,2 ml Mischserum (Tab.1).

Anzahl der Bestimmungen	Gesamt-Phosphor (γ)	Kephalin Phosphor (γ)	Lecithin Phosphor (γ)	Sphingomyelin Phosphor (γ)	Lysolecithin Phosphor (γ)
10	16,68 ±0,26	0,47 ±0,02	11,6 ±0,19	3,7 ±0,18	0,83 ±0,05

Tab.1. Phosphorgehalt der Gesamtlipide und der dünnschichtchromatographisch getrennten Phosphatidfraktionen eines Mischserums (Mittelwerte ± Standardabweichung).

Bei der Ermittlung des Phosphorgehaltes der ninhydrin-positiven Substanzen aus den dünnschichtchromatographisch getrennten Serumlipidextrakten eines Gesunden und eines Arteriosklerosekranken ergab sich für die Kephalinfraktion Übereinstimmung mit den zuvor ermittelten Werten nach Bromthymolblaufärbung. Die fünf unteren ninhydrin-positiven Fraktionen erwiesen sich phosphorfrei, während über die beiden oberen keine Aussagen gemacht werden können, da

diese sich mit der Lysolecithinfraktion bzw. dem unteren Anteil des Sphingomyelinflecks überschneiden.

Die Einzelergebnisse der Bestimmungen der Gesamtlipide, der Gesamtphosphatide und der einzelnen Phosphatidfraktionen im Serum von 20 Gesunden und 20 Arteriosklerosekranken sind in den Tabellen 6, 7, 8 und 9 zusammengestellt.

Gesamtlipide und Gesamtphosphatide:

Bei den 20 gesunden Versuchspersonen schwankten die Gesamtlipidwerte im Blutserum zwischen 480 und 907 mg%, die Gesamtphosphatidwerte zwischen 151 und 237 mg%. Bei den 20 Arteriosklerosekranken lagen die Werte für die Gesamtlipide zwischen 666 und 1863 mg%, die der Gesamtphosphatide zwischen 172 und 398 mg%. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind aus Tab.2 zu ersehen. Bei der statisti-

	Gesamtlipide (mg%)	Gesamtphosphatide (mg%)
Gesunde	706 ±136	199 ±23
Arteriosklerosekranke	1020 ±301	255 ±59

Tab.2. Gesamtlipide und Gesamtphosphatide (Mittelwerte ± Standardabweichungen) im Blutserum von 20 Gesunden und 20 Arteriosklerosekranken.

schen Auswertung erwies sich der Unterschied der mittleren Gesamtlipid- und der mittleren Gesamtphosphatidkonzentration zwischen Gesunden und Arteriosklerosekranken als hoch signifikant (in beiden Fällen $P < 0{,}001$).

Die einzelnen Phosphatidfraktionen:

Für die Kephalinfraktion ergaben sich bei den Gesunden Werte zwischen 4 und 8 mg%, bei den Arteriosklerosekranken Werte zwischen 4 und 15 mg%. Bei der Lecithinkonzentration variierten die Werte von 93 bis 162 mg% für die Gesunden

und von 108 bis 267 mg% für die Patienten. Die für Sphingomyelin bestimmten Werte lagen bei den Gesunden zwischen 35 und 54 mg% und bei den Arteriosklerosekranken zwischen 42 und 88 mg%. Der Lysolecithingehalt betrug bei den Gesunden 8 bis 37 mg% und bei den Patienten 6 bis 57 mg%. Die mittleren Konzentrationen der einzelnen Serumphosphatide bei Gesunden und Arteriosklerosekranken sind in Tab.3 zusammengestellt.

	Kephalin (mg%)	Lecithin (mg%)	Sphingomyelin (mg%)	Lysolecithin (mg%)
Gesunde	6 ±1	132 ±19	43 ±6	19 ±6
Arteriosklerosekranke	8 ±2	170 ±41	57 ±11	21 ±14

Tab.3. Konzentrationen der einzelnen Phosphatide im Serum von 20 Gesunden und 20 Arteriosklerosekranken (Mittelwerte ± Standardabweichungen).

Der geringe Unterschied zwischen dem Serumkephalingehalt der Gesunden und der Arteriosklerosekranken liess sich statistisch sichern ($0{,}02 > P > 0{,}01$). Als hochsignifikant erwiesen sich die Unterschiede in der Lecithin- und Sphingomyelinkonzentration (in beiden Fällen $P < 0{,}001$). Dagegen bestand zwischen den Lysolecithinkonzentrationen beider Gruppen angesichts der erheblichen Schwankungen keine statistisch signifikante Differenz ($0{,}5 > P > 0{,}4$).

Es interessierte besonders, ob Unterschiede im prozentualen Anteil der einzelnen Phosphatidfraktionen an der Gesamtphosphatidmenge bei den Gesunden gegenüber den Arteriosklerosekranken bestünden. Die errechneten Werte sind in Tab.4 zusammengestellt. Danach bestehen hinsichtlich des prozentualen Anteils der einzelnen Serumphosphatide an

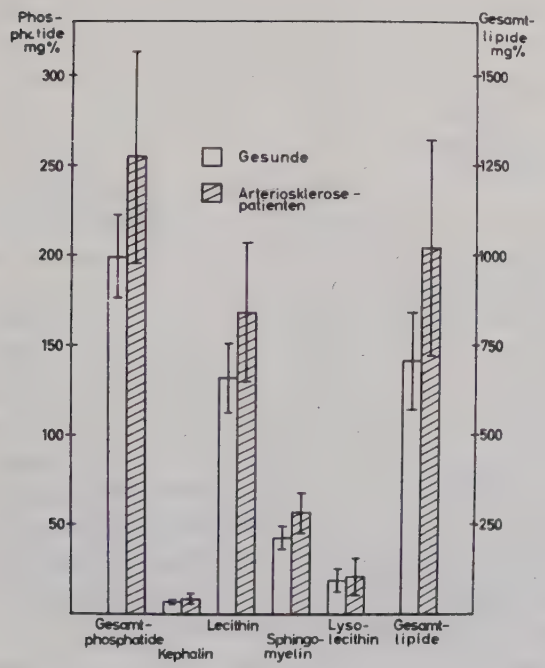


Abb.9. Gesamtlipid- und Phosphatidgehalte des Serums Gesunder und Arteriosklerosekranker.

	Kephalin (%)	Lecithin (%)	Sphingomyelin (%)	Lysolecithin (%)
Gesunde	3,0 ±0,5	66,0 ±4,7	21,5 ±2,5	9,4 ±3,5
Arteriosklerosekranke	3,0 ±0,8	66,4 ±5,4	22,6 ±2,9	8,0 ±4,3

Tab.4. Prozentuale Anteile der einzelnen Phosphatidfraktionen an den Gesamtphosphatiden des Serums Gesunder und Arteriosklerosekranker (Mittelwerte ± Standardabweichung).

der Gesamtphosphatidmenge zwischen den Gesunden und Arteriosklerosepatienten keinerlei signifikante Unterschiede.

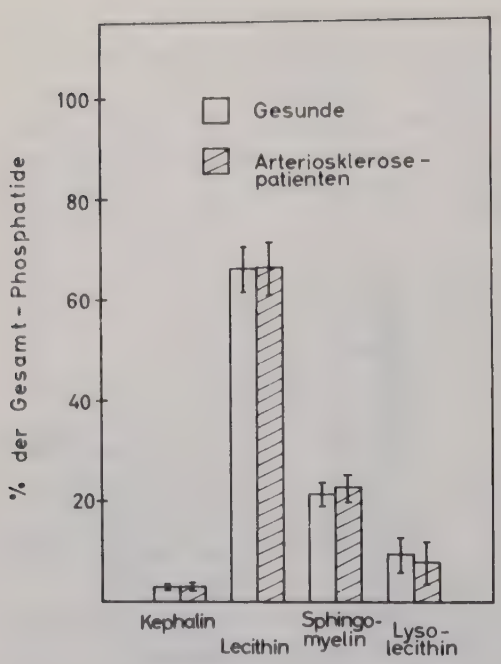


Abb.10. Prozentuale Zusammensetzung der Serumphosphatide von Gesunden und Arteriosklerosekranken.

D. Diskussion

Wie die Untersuchungen über die Höhe und die Verteilung der Phosphorleerwerte auf der Dünnschichtplatte und die Werte, die bei der Untersuchung über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch zehnmalige Bestimmung des Phosphorgehalts der einzelnen Phosphatidfraktionen eines Mischserums ermittelt wurden, zeigen, sind in dieser Hinsicht von der hier angewandten Methodik keine nennenswerten Fehler zu erwarten.

DOIZAKI und ZIEVE (10) führten zur quantitativen Bestimmung von Phosphatiden und deren Hydrolyseprodukten auf Dünnschichtplatten Korrekturfaktoren ein, da sie Verluste von 10 - 20 % bei den einzelnen Phosphatidfraktionen feststellten. Diese Autoren fanden z. B., dass ein Teil der phosphorhaltigen Verbindungen am Startpunkt zurückbleibt,

ein anderer bei der nachfolgenden Veraschung an die Kieselsäure adsorbiert wird. Bei den Untersuchungen dieser Arbeit fanden sich in den ebenfalls analysierten Startlinienfraktionen niemals Phosphorwerte, die über den entsprechenden Kieselsäureleerwerten lagen. Die genannten Verluste bei der Veraschung sind wahrscheinlich dadurch bedingt, dass die oben genannten Autoren die Methode von BARTLETT (4) modifizierten und statt mit einer 10 n mit konzentrierter Schwefelsäure bei einer Veraschungstemperatur von 250 - 260°C arbeiteten. In den vorliegenden Untersuchungen dagegen stimmten die durch direkte Bestimmung aus dem Gesamtlipidextrakt und die durch Addition der dünnschichtchromatographisch getrennten Phosphatidfraktionen erhaltenen Gesamtphosphor- bzw. Gesamtphosphatidmengen überein. Es traten demnach im Aufarbeitungs- und Analysengang keine Phosphorverluste ein. Lediglich bei dem Versuch, die dünnschichtchromatographisch getrennten Phosphatidfraktionen durch Elution mit organischen Lösungsmitteln von der Kieselsäure zu trennen, wurden solche Verluste beobachtet.

Von Wichtigkeit sind auch eventuell störende Beimengungen im Lipidextrakt, welche nicht Lipoidnatur besitzen. Phosphorfreie Verbindungen wie Aminosäuren, Zucker, Harnstoff, anorganische Salze usw. stören nicht. Durch die vergleichenden Phosphorbestimmungen in nach der geschilderten Methodik hergestellten Serumlipidextrakten und solchen, die noch zusätzlich der Diffusionsreinigung nach FOLCH u. Mitarb. (13) unterworfen wurden, konnten keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden. Man kann demnach annehmen, dass bei dem gewählten Extraktionsverfahren anorganischer Phosphor, Nukleotidphosphor, wasserlösliche Phosphatester u. a. nicht in messbaren Mengen in den Lipidextrakt eingehen.

Zu weiteren methodischen Erwägungen gaben die Untersuchungen von NOTHMAN und PROGER (29) über die Kephalinkonzentration im Blutserum Anlass. Diese Autoren fanden bei Gesunden und Arteriosklerosekranken Gesamtphosphatidwerte, die mit den hier angegebenen übereinstimmen. Im Gegensatz dazu liegen ihre Werte für den Kephalingehalt des Plasmas (Colamin- und Serinkephalin) absolut mit 13,3 mg% bei Ge-

sunden und 40,4 mg% bei Patienten mit Koronarsklerose und, auf die Gesamtphosphatide bezogen, mit 6,8 bzw. 12,9 % erheblich über denen dieser Arbeit. Diese Ergebnisse wurden mit der von AXELROD u. Mitarb. (3) angegebenen Methode erzielt, bei der nach Fällung des Plasmas mit kolloidaler Eisenlösung die aus dem Präzipitat extrahierten Phosphatide hydrolysiert und die Kephalinbasen Colamin und Serin nach Reaktion mit Dinitrofluorbenzol als Dinitrophenylverbindungen spektrophotometrisch bestimmt werden. DITTMER u. Mitarb. (9) fanden bei der Überprüfung dieser Methode, dass diese Farbreaktion auch mit dem bei Hydrolyse freigesetzten Ammoniak eintritt. Ausserdem soll Dinitrofluorbenzol mit o-Phosphorcolamin, mit primären Aminen einschliesslich Sphingosin und natürlich auch mit Aminosäuren reagieren.

Wie an einem ninhydringefärbten Dünnschichtchromatogramm eines nach Eisenfällung gewonnenen Lipidextrakts (Abb.8) gezeigt werden konnte, enthält dieses ausser der Kephalinfraktion keine ninhydrin-positiven Substanzen abgesehen von einer geringen Anfärbung an der Startlinie. Die höheren Werte von NOTHMAN und PROGER (29) können also nicht durch die etwa unvollständige Entfernung von mit Dinitrofluorbenzol reagierenden Verunreinigungen erklärt werden.

Die niedrigeren Kephalinwerte dieser Arbeit könnten ihren Grund darin haben, dass etwa vorhandenes Lysokephalin nicht erfasst wurde. MARINETTI u. Mitarb. (28) vermuten, dass Lysocolaminkephalin im Blutserum vorkommt. Bei der Chromatographie von Phosphatiden des Rattenherzens auf mit Kieselsäure imprägniertem Papier konnte MARINETTI (27) Lysocolaminkephalin nachweisen, welches zwischen der Lecithin- und der Sphingomyelinfraktion wanderte. Wie das ninhydringefärbte Dünnschichtchromatogramm des Lipidextrakts eines Normalserums (Abb.5) zeigt, sind ausser der Kephalinfraktion nur noch etwa 7 startpunktnahe Fraktionen zu sehen, die wegen fehlenden Phosphorgehalts Aminosäuren bzw. niederen Peptiden zuzuordnen sind [THIELE und WOBER (39)]. Ninhydringefärbte Dünnschichtchromatogramme von Lysokephalin allein und als Zusatz zum Lipidextrakt eines Normalserums (Abb.6) zeigen, vor allem nach Darstellung

auch der übrigen Phosphatidfraktionen durch Besprühen mit Phosphorammoniummolybdat (Abb.7), dass Lysokephalin auch bei dünnschichtchromatographischer Trennung zwischen Lecithin und Sphingomyelin anzutreffen ist. Da in diesem Bereich weder bei Extrakten aus dem Serum Gesunder noch aus dem Arteriosklerosekranker jemals eine ninhydrin-positive Substanz gefunden wurde, muss das Vorkommen von Lysokephalin im Blutserum angezweifelt werden.

Aus den Tabellen 6 und 7 ist zu ersehen, dass bei den Lysolecithinwerten die grössten Standardabweichungen gefunden wurden. Obgleich die Lipide jeweils sofort nach Retraktion des Blutkuchens extrahiert wurden, hat offenbar je nach Aktivität der Cholesterinesterase des Blutes selbst bei Zimmertemperatur und der kurzen Zeit von 1 - 2 Stunden, die bis zur Extraktion vergingen, eine Abspaltung von Lecithinfettsäuren stattgefunden und so zu wechselnden Lysolecithinmengen geführt. Dieser Vorgang lässt sich nach VOGEL u. Mitarb. (41) sogar bei eingefrorenem Serum beobachten.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse könnten Bedenken auftauchen, da die untersuchten Gesunden und Arteriosklerosekranken nicht derselben Altersgruppe angehören. Bei der Untersuchung von Gesunden der Altersgruppen 20 - 29 Jahre und 32 - 56 Jahre fand COHEN (8) einen minimalen Anstieg der Gesamtphosphatidspiegel von 246 auf 247 mg%. Auch SCHRADE u. Mitarb. (34) beobachteten nur eine geringe Zunahme von 202 mg% bei 18 - 42jährigen auf 219 mg% bei 46 - 71jährigen Gesunden. Hier ist jedoch zu bedenken, dass bei älteren Personen eine beginnende Arteriosklerose nie mit Sicherheit auszuschliessen ist. Da es aber in den vorliegenden Untersuchungen hauptsächlich auf den Vergleich der relativen Zusammensetzung der einzelnen Phosphatidfraktionen ankam, dürfte die Differenz der Altersmittelwerte nicht von ausschlaggebender Bedeutung sein.

Vergleicht man die hier angegebenen Werte für Gesamtlipide und Gesamtphosphatide von Gesunden und Arteriosklerosekranken mit denen anderer Autoren, so findet man völlige Übereinstimmung mit SCHRADE u. Mitarb. (34 und 35) und HAUSS und BÖHLE (18). COHEN (8) berichtet von ins-

gesamt höheren Phosphatidgehalten (247 mg% bei Gesunden und 272 mg% bei Koronarsklerotikern), deren Unterschied sich statistisch sichern lässt ($P < 0{,}05$). Noch höher liegen die Werte von GERTLER u. Mitarb. (15) mit 299 und 316 mg%.

Angaben über den prozentualen Anteil der einzelnen Phosphatidfraktionen an den Gesamtphosphatiden des Blutserums von Arteriosklerosekranken sind nicht häufig. Auf die Resultate von NOTHMAN und PROGER (29) wurde oben hingewiesen. COHEN (8) kommt, da er mit einer cholinspezifischen mikrobiologischen Methode arbeitet, zu einer Unterteilung in cholinhaltige und cholinfreie Phosphatide. Für die letzteren findet er ausserordentlich hohe Werte, 52 mg% bei Gesunden und 61 mg% bei Arteriosklerosekranken; im prozentualen Anteil ist jedoch mit 21 bzw. 22 % kein nennenswerter Unterschied zu verzeichnen.

Die Auftrennung der Serumphosphatide ist ausser durch Dünnschichtchromatographie auch durch Säulenchromatographie oder Chromatographie auf mit Kieselsäure imprägniertem Papier möglich. Eine Reihe von Autoren berichten über Relativwerte bei Normalpersonen, die in Tab.5 zusammengestellt sind. GJONE u. Mitarb. (16) trennten die Phosphatide an einer Kieselsäuresäule, erzielten damit allerdings nicht in jedem Fall sehr scharfe Trennungen. Die übrigen in Tab.5 angegebenen Werte wurden durch Chromatographie auf mit Kieselsäure imprägniertem Papier ermittelt. Tab.5 zeigt, dass sich die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen von GJONE u. Mitarb. (16), VOGEL u. Mitarb. (41), PHILLIPS (30) und MARINETTI u. Mitarb. (28) nahezu völlig decken.

Von Interesse ist ein Vergleich mit dem Phosphatidgehalt der menschlichen Aorta. KAYDEN und STEELE (22) berichteten, dass der Quotient aus Lecithin- und Sphingomyelingehalt der Intima, der bei Gesunden etwa 5 beträgt, bei Arteriosklerosekranken bis unter 1 fällt. Auch SMITH (37) berichtet von einer Zunahme des Sphingomyelinanteils der Aortenmedia von 45 % in gesunden auf 70 % in arteriosklerotisch veränderten Gefässen. BÖTTCHER und VAN GENT (6) fanden bei der Aufarbeitung der Intima und

Autor	Kephalin bzw. nicht identifiziert	Lecithin	Sphingo-myelin	Lyso-lecithin
GJONE u. Mitarb.	6	66	18	9
VOGEL u. Mitarb.	2	66	23	9
PHILLIPS	5	69	19	7
MARINETTI u. Mitarb.	3	67	21	9
Eigene Werte	3	66	21	9

Tab.5. Prozentualer Anteil der einzelnen Phosphatidfraktionen im Blutserum Gesunder bei verschiedenen Autoren.

des grössten Teils der Media eine Zunahme des Sphingomyelinanteils von 35 % bei garantiert nicht befallenen Blutgefässen von Kindern auf 62 % bei voll ausgebildeter Arteriosklerose. Dafür nahm der Anteil des Lecithins von 43 auf 23 % und der des Kephalins von 18 auf 9 % ab, während die Lysolecithinwerte gleichblieben.

E. Zusammenfassung

Bei der lipidchemischen Analyse des Serums von Gesunden und Arteriosklerosekranken fand sich bei den Patienten eine signifikante Erhöhung der Gesamtlipide und der Gesamtphosphatide. Die Bestimmung der dünnschichtchromatographisch getrennten einzelnen Phosphatide ergab eine statistisch gesicherte Zunahme des Lecithin-, des Sphingomyelin- und des Kephalingehalts bei den Arteriosklerosekranken. Die prozentuale Zusammensetzung der Phosphatide zeigte keine Unterschiede zwischen Gesunden und Kranken. Der von NOTHMAN und PROGER (29) erhobene Befund eines um das 2 - 3fache vermehrten Kephalingehalts im Serum von Arteriosklerosekranken konnte nicht bestätigt werden.

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	Gesamtlipide (mg%)	Phosphatide (mg%)	Kephalin (mg%)	Lecithin (mg%)	Sphingomyelin (mg%)	Lysolecithin (mg%)
1	26	m	gesund	652	212	6	145	43	18
2	22	w	"	637	151	6	93	36	17
3	27	m	"	616	182	5	126	40	11
4	24	w	"	698	201	7	141	38	15
5	28	w	"	865	235	8	162	53	13
6	26	m	"	480	186	5	100	50	32
7	21	w	"	699	190	6	127	36	21
8	23	w	"	886	215	8	151	46	11
9	28	w	"	907	203	6	138	52	8
10	31	w	"	586	187	6	127	41	13
11	24	m	"	886	211	7	150	37	18
12	24	m	"	856	213	6	145	40	21
13	25	m	"	538	163	4	107	35	18
14	21	w	"	758	229	6	158	46	20
15	25	m	"	633	195	5	128	41	22
16	39	w	"	600	196	5	134	39	17
17	24	m	"	545	165	4	100	37	25
18	26	m	"	860	205	6	126	52	21
19	35	m	"	805	237	7	139	54	37
20	27	w	"	615	203	8	141	40	14
Mittelwert				706	199	6	132	43	19
Standardabweichung				136	23	1	19	6	6

Tab.6. Gesamtlipid-, Phosphatid-, Kephalin-, Lecithin-, Sphingomyelin- und Lysolecithingehalt des Serums von Gesunden.

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	Gesamt-lipide (mg%)	Phospha-tide (mg%)	Kepha-lin (mg%)	Leci-thin (mg%)	Sphingo-myelin (mg%)	Lyso-lecithin (mg%)
1	71	w	Allg.Gefäss-Sklerose	982	243	9	175	44	16
2	79	w	Zerebrale u. peri-phere Sklerose	923	230	9	163	42	16
3	68	w	Koronarsklerose	857	221	5	146	56	14
4	76	w	Allg.Gefäss-Sklerose	777	201	6	137	52	6
5	84	w	Koronarsklerose	902	303	5	222	62	15
6	75	w	Zerebralsklerose	1004	220	5	128	58	29
7	57	m	Koronarsklerose	911	207	6	142	48	11
8	82	m	Allg.Gefäss-Sklerose	1003	263	15	180	55	13
9	63	m	Koronarsklerose	893	237	7	159	58	13
10	54	w	Koronarsklerose	758	199	5	108	50	36
11	61	w	Koronarsklerose	1863	354	10	199	88	57
12	76	w	Koronarsklerose	666	172	6	117	43	6
13	65	w	Koronarsklerose	889	256	8	180	53	16
14	82	w	Allg.Gefäss-Sklerose	717	184	4	108	51	22
15	73	m	Myokardinfarkt	915	238	7	169	48	15
16	57	m	Myokardinfarkt	1200	277	9	191	64	13
17	46	m	Myokardinfarkt	1673	398	11	267	73	47
18	45	m	Myokardinfarkt	1255	311	11	195	66	39
19	59	m	Koronarsklerose	981	249	8	173	53	15
20	67	w	Allg.Gefäss-Sklerose	1233	332	9	232	71	20
Mittelwert				1020	255	8	170	57	21
Standardabweichung				301	59	2	41	11	14

Tab.7. Gesamtlipid-, Phosphatid-, Kephalin-, Lecithin-, Sphingomyelin- und Lysolecithingehalt des Serums von Arteriosklerosekranken.

Nr.	Kephalin	Lecithin	Sphingomyelin	Lysolecithin
1	2,8	68,4	20,3	8,5
2	3,9	61,2	23,7	11,2
3	2,7	69,2	22,0	6,0
4	3,5	70,1	18,9	7,5
5	3,4	68,6	22,5	5,5
6	2,7	53,5	26,7	17,1
7	3,2	66,8	18,9	11,1
8	3,7	69,9	21,3	5,1
9	2,9	67,6	25,5	3,9
10	3,2	67,9	21,9	7,0
11	3,3	70,8	17,5	8,5
12	2,8	68,4	18,9	9,9
13	2,4	65,2	21,3	11,0
14	2,6	68,7	20,0	8,7
15	2,6	65,3	20,9	11,2
16	2,6	68,7	20,0	8,7
17	2,4	60,2	22,3	15,1
18	2,9	61,5	25,4	10,2
19	3,0	58,6	22,8	15,6
20	3,9	69,5	19,7	6,9
M	3,0	66,0	21,5	9,4
S	0,5	4,7	2,5	3,5

Tab.8. Prozentuale Zusammensetzung der Phosphatidfraktion des Serums von Gesunden (M = Mittelwert, S = Standardabweichung).

Nr.	Kephalin	Lecithin	Sphingomyelin	Lysolecithin
1	3,7	71,7	18,0	6,6
2	3,9	70,9	18,3	7,0
3	2,3	66,1	25,3	6,3
4	3,0	68,2	25,9	3,0
5	1,6	73,0	20,4	4,9
6	2,3	58,2	26,4	13,2
7	2,9	68,6	23,2	5,3
8	5,7	68,4	20,9	4,9
9	3,0	67,1	24,5	5,5
10	2,5	54,3	25,1	18,1
11	2,8	56,2	24,9	16,1
12	3,5	68,0	25,0	3,5
13	3,1	70,0	20,6	6,2
14	2,2	58,4	27,6	11,9
15	2,9	70,7	20,1	6,3
16	3,2	69,0	23,1	4,7
17	2,8	67,1	18,3	11,8
18	3,5	62,7	21,2	12,5
19	3,2	69,5	21,3	6,0
20	2,7	69,9	21,4	6,0
M	3,0	66,4	22,6	8,0
S	0,8	5,4	2,9	4,3

Tab.9. Prozentuale Zusammensetzung der Phosphatidfraktion des Serums von Arteriosklerosekranken (M = Mittelwert, S = Standardabweichung).

G. Literaturverzeichnis

(1) AHRENS, E. H. und H. G. KUNKEL
The stabilization of serum lipid emulsions by serum phospholipids.
J. Exper. Med. 90, 409 (1949)

(2) ALBRINK, M. J. und E. B. MAN
Serum triglycerides in coronary artery disease.
Arch. Int. Med. 103, 4 (1959)

(3) AXELROD, J., J. REICHENTHAL und B. B. BRODIE
The direct determination of phosphatidyl ethanolamine and phosphatidyl serine in plasma and red blood cells.
J. biol. Chem. 204, 903 (1953)

(4) BARTLETT, G. R.
Phosphorus assay in column chromatography.
J. biol. Chem. 234, 466 (1959)

(5) BJÖRNTORP, P. und R. MALMCRONA
Serum cholesterol in patients with myocardial infarction in younger ages.
Acta Med. Scand. 168, 151 (1960)

(6) BÖTTCHER, C. J. F. und C. M. VAN GENT
Changes in the composition of phospholipids and of phospholipid fatty acids associated with atherosclerosis in the human aortic wall.
J. Atheroscler. Res. 1, 36 (1961)

(7) CHAPIN, M. A. und S. PROGER
The distribution of lipid and phospholipid in paper electrophoresis of the serum lipoproteins in normal subjects and in patients with atherosclerosis.
J. Laborat. Clin. Med. 54, 39 (1959)

(8) COHEN, L.
Serum phospholipids in coronary artery disease.
J. Laborat. Clin. Med. 54, 352 (1959)

(9) DITTMER, J. C., J. L. FEMINELLA und D. J. HANAHAN
A study of the quantitative estimation of ethanolamine and serine in phospholipids.
J. biol. Chem. 233, 862 (1958)

(10) DOIZAKI, W. M. und L. ZIEVE
Quantitative estimation of some phosphatides and their hydrolysis products by thin layer chromatography.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113, 91 (1963)

(11) DUGUID, J. B.
The pathogenesis of arterial narrowing.
Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss. 13, 73 (1957)

(12) FISKE, C. H. und Y. SUBBAROW
Colorimetric determination of phosphorus.
J. biol. Chem. 66, 375 (1925)

(13) FOLCH, J., M. LEES und G. H. S. STANLEY
A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.
J. biol. Chem. 226, 497 (1957)

(14) GABY, W. L. und R. SILBERMAN
The role of phospholipids in the metabolism of amino acids. II. The incorporation of leucine and tyrosine in liver phospholipids.
Arch. Biochem. Biophys. 87, 188 (1960)

(15) GERTLER, M. M., S. M. GARNS und J. LERMAN
The interrelationship of serum cholesterol, cholesterol esters and phospholipids in health and in coronary artery disease.
Circulation 2, 205 (1950)

(16) GJONE, E., J. F. BERRY und D. A. TURNER
The isolation and identification of lysolecithin from lipid extracts of normal human serum.
J. Lipid Res. 1, 66 (1959)

(17) HABERMANN, E., G. BANDTLOW und B. KRUSCHE
Bestimmung von Plasma-Phospholipiden nach Dünnschichtchromatographie.
Klin. Wschr. 39, 816 (1961)

(18) HAUSS, W. H. und E. BÖHLE
Über die Fettfraktionen im Blut bei Kreislaufkranken,insbesondere bei Herzinfarktpatienten.
Dtsch. Arch. klin. Med. 202, 579 (1955)

(19) HENDLER, R. W.
Some properties and the possible metabolic significance of amino acid-lipid complexes.
Biochim. Biophys. Acta 49, 297 (1961)

(20) HEYMAN, A., M. D. NEFZGER und E. H. ESTES, Jr.
Serum cholesterol level in cerebral infarction.
Arch. Neurol. 5, 264 (1961)

(21) JANDER, W.
Lehrbuch für das anorganisch-chemische Praktikum.
S. Hirzel Verlag, 5. Aufl. (Leipzig, 1944), S. 181

(22) KAYDEN, H. J. und J. M. STEELE
The phospholipid composition of human aortic intima.
Circulation 14, 482 (1956)

(23) KEYS, A., O. MICKELSEN, E. O. MILLER, E. R. HAYES und R. L. TODD
The concentration of cholesterol in the blood serum of normal men and its relation to age.
J. Clin. Invest. 29, 1347 (1950)

(24) KOMMERELL, B.
Die Wirkung der Nahrungsfette auf die Blutgerinnung und die Beziehung zur Arteriosklerose.
Helvet. Med. Acta 30, 177 (1963)

(25) LEUPOLD, F. und H. WIELAND
Zur Frage der Diagnose und Prophylaxe der Arteriosklerose.
Internat. J. Prophylakt. Med. u. Soz. Hyg. 2, 54 (1958)

(26) LUND, J. C., E. SIVERTSSEN und H. C. GODAL
Studies on serum lipids. II. Patients with myocardial infarction.
Acta Med. Scand. 169, 629 (1961)

(27) MARINETTI, G. V.
Chromatographic separation, identification, and analysis of phosphatides.
J. Lipid Res. 3, 1 (1962)

(28) MARINETTI, G. V., M. ALBRECHT, T. FORD und E. STOTZ
Analysis of human plasma phosphatides by paper chromatography.
Biochim. Biophys. Acta 36, 4 (1959)

(29) NOTHMAN, M. M. und S. PROGER
Cephalins in the blood.
J. Am. Med. Ass. 179, 40 (1962)

(30) PHILLIPS, G. B.
The isolation and quantitation of the principle phospholipid components of human serum using chromatography on silicic acid.
Biochim. Biophys. Acta 29, 594 (1958)

(31) ROBINSON, D. S. und J. C. F. POOLE
Similar effect of chylomicra and ethanolamine phosphatide on generation of thrombin during coagulation.
Quart. J. Exp. Physiol. 41, 36 (1956)

(32) SCHAEFER, L. E., D. ADLERSBERG und A. STEINBERG
Serum phospholipids, genetic and environmental influences.
Circulation 18, 341 (1958)

(33) SCHETTLER, G.
Lipidosen.
Hdb. d. inn. Med. VII/2, 626 (1955)

(34) SCHRADE, W., R. BIEGLER und E. BÖHLE
Fatty-acid distribution in the lipid fractions of healthy persons of different age, patients with atherosclerosis and patients with idiopathic hyperlipidaemia.
J. Atheroscler. Res. 1, 47 (1961)

(35) SCHRADE, W., E. BÖHLE und R. BIEGLER
Über den Polyensäurengehalt der verschiedenen Lipidfraktionen des Blutes bei der Arteriosklerose und dem Diabetes mellitus.
Klin. Wschr. 37, 1101 (1959)

(36) SMITH, E. B.
Examination by paper chromatography of the different phospholipids in serum lipoprotein fractions and in atheromatous aorta.
IV. Internat. Kongr. f. Biochemie (Wien, 1958)

(37) SMITH, E. B.
Intimal and medial lipids in human aortas.
Lancet I, 799 (1960)

(38) SPERRY, W. M.
Methods of biochemical analysis.
Ed. D. Glick, Interscience Publishers, Vol. II (NewYork, 1955)

(39) THIELE, O. W. und W. WOBER
Zur papierchromatographischen Trennung von Phosphatiden auf einem neuartigen Kieselgelpapier.
Hoppe-Seylers Zschr. physiol. Chem. 326, 89 (1961)

(40) THOMAS, C. B., H. W. D. HOLLJES und F. F. EISENBERG
Observations on seasonal variations in total serum cholesterol level among healthy young prisoners.
Ann. Intern. Med. 54, 413 (1961)

(41) VOGEL, W. C., L. ZIEVE und R. O. CARLETON
Measurement of serum lecithin, lysolecithin, and sphingomyelin by a simplified chromatographic technique.
J. Laborat. Clin. Med. 59, 335 (1962)

(42) WINDAUS, A.
Über den Gehalt normaler und atheromatöser Aorten an Cholesterin und Cholesterinestern.
Zschr. physiol. Chem. 67, 174 (1910)

(43) ZÖLLNER, N. und K. KIRSCH
Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulphophosphovanillin-Reaktion.
Z. ges. exp. Med. 135, 545 (1962)

Herrn Prof. Schettler danke ich sehr für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und die guten Arbeitsmöglichkeiten, die mir an seiner Klinik geboten wurden. Dem Laborleiter Herrn Dr. Wagener gilt mein besonderer Dank für die allzeit gewährten wissenschaftlichen und technischen Ratschläge bei der Durchführung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 17. Januar 1937 wurde ich als Sohn des Paul Lang, Apotheker, und seiner Ehefrau Liselotte, geb. Wurzler, Apothekerin, als ältester von vier Brüdern in Geislingen an der Steige geboren. Dort durchlief ich die Grundschule und das Gymnasium, das ich mit der Reifeprüfung am 29. Februar 1956 abschloss. Nach zweijährigem Apothekenpraktikum legte ich in Stuttgart die pharmazeutische Vorprüfung ab und studierte anschliessend an der Universität Tübingen zwei Semester Pharmazie. Nach dem Wechsel zur Medizinischen Fakultät legte ich am 29. Juli 1959 in München die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 25. Februar 1961 an der Universität des Saarlandes das Physikum ab. Seither studiere ich an der Freien Universität Berlin. Am 4. November 1963 verheiratete ich mich mit der Studentin der Philosophie Erdmute, geb. Kreysler. Mit den Prüfungen des ärztlichen Staatsexamens habe ich am 15. August 1964 begonnen.